



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 44 08 011 C 1

⑤① Int. Cl.⁶:
A 61 K 31/685
A 61 K 31/575

②① Aktenzeichen: P 44 08 011.5-41
②② Anmeldetag: 10. 3. 94
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 2. 11. 95

D 2

DE 44 08 011 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

⑦③ Patentinhaber:

Max-Deibrock-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦② Erfinder:

Arndt, Dieter, Dr., 12589 Berlin, DE; Zeisig, Reiner,
Dr., 10435 Berlin, DE; Fichtner, Iduna, Dr., 13125
Berlin, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

Anticancer Drugs 4 (1), 57-64 (1993);
Anticancer Drugs 2 (4), 411-417 (1991);

⑤④ Pharmazeutisches Mittel zur Tumorthherapie

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Mittel zur
Tumorthherapie auf der Basis von Etherlipiden und Alkylphos-
phocholinen, seine Herstellung und Verwendung. Anwen-
dungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die
pharmazeutische Industrie.

Das erfindungsgemäße Mittel ist dadurch gekennzeichnet,
daß es in liposomaler Form vorliegt und folgende Kompo-
nenten enthält:

- ein Phospholipid-Analoges
- Cholesterol
- ein polyethylenglycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid)
- ggf. ein Lipid mit positiver oder negativer Oberflächenla-
dung
- ggf. weitere Wirkstoffe, sowie
- pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe.

DE 44 08 011 C 1

Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Mittel zur Tumorthherapie auf der Basis von Etherlipiden und Alkylphosphocholinen, seine Herstellung und Verwendung. Anwendungsbeispiele der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Etherlipide und Alkylphosphocholine stellen eine neue Gruppe alternativer Cytostatika dar. Ihre Wirkung kommt nicht durch Eingriffe in das genetische Material der Zelle zustande, vielmehr scheinen durch das Pharmakon bewirkte Veränderungen der Tumorzellmembran für die antineoplastischen Effekte wesentlich zu sein (Berdel, Br. J. Cancer 64 (1991) 208–211). Bei der therapeutischen Testung dieser Verbindungen an tumortragenden Nagern fällt auf, daß die besten Resultate mit chemisch induzierten Mammatumoren erhalten werden, während die Substanzen bei den klassischen Testmodellen, wie der P388 Leukämie oder dem B16 Melanom wenig wirksam sind. In der Regel wird die therapeutische Wirksamkeit nur bei wiederholter Applikation des Wirkstoffs erzielt. Eine erhebliche Einschränkung des therapeutischen Potentials der Etherlipide und der Alkylphosphocholine ergibt sich aus ihren hämolytischen und gewebsnekrotischen Nebenwirkungen. Durch Applikation o. g. Lipide in vesikulärer Form (Liposomen) hat man diese Nebenwirkungen reduziert (Zeisig et al., Anti-Cancer Drugs 2 (1991) 411–417; DE 41 32 345 A1). Die antineoplastische Wirksamkeit der liposomalen Form entspricht dabei etwa der Wirksamkeit des freien Wirkstoffs. Dabei ist hier, wie auch bei vielen anderen Beispielen der Verabfolgung liposomaler Wirkstoffe von Nachteil, daß die Vesikel rasch von phagocytotisch aktiven Zellen, insbesondere in Leber und Milz aufgenommen werden. Durch Verwendung von Lipiden mit speziellen Kopfgruppen kann eine verminderte Aufnahme durch phagocytotisch aktive Zellen und Gewebe erreicht werden (Woodle und Lasic, Biochim. Biophys. Acta 1113 (1992) 171–199; WO 88/04924). Bisher sind keine Liposomen bekannt, die aus Lipiden mit Antitumorwirkung bestehen und zugleich eine verlängerte Verweildauer in biologischen Flüssigkeiten zeigen.

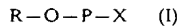
Ziel der Erfindung ist die Schaffung einer Arzneimittelzusammensetzung auf Lipidbasis, die die Nebenwirkungen weitgehend ausschaltet und die gegen den Tumor gerichtete Wirksamkeit steigert.

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist ein Mittel zur Tumorthherapie, das in liposomaler Form vorliegt, aus Etherlipiden oder Alkylphosphocholinen und Verbindungen besteht, die eine rasche Eliminierung aus der Zirkulation verhindern.

Im einzelnen ist es durch folgende Zusammensetzung charakterisiert:

- ein Phospholipid-Analoges
- Cholesterol
- ein polyethylenglycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid)
- ggf. ein Lipid mit positiver oder negativer Oberflächenladung
- ggf. weitere Wirkstoffe und pharmazeutisch üblichen Träger- und Hilfsstoffe.

Als Phospholipid-Analoga werden Alkylphospholipide mit Antitumorwirkung der allgemeinen Struktur I eingesetzt,

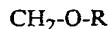


dabei bedeuten:

- R einen Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylrest mit 14 bis 22 C-Atomen
- O Sauerstoff oder Schwefel
- P Phosphor
- X einen Cholin- oder einen modifizierten Cholinrest, einen Serin- oder einen Ethanolaminrest.

Bevorzugte Verbindungen sind Hexadecylphosphocholin, Octadecylphosphocholin, Erucylphosphocholin, Octadecyl-[2-(N-methylpiperidinio)ethyl]phosphat, Octadecylphosphoethanolamin und Hexadecylphosphoserin.

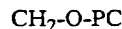
Als Phospholipid-Analoga werden ferner Etherlipide mit Antitumorwirkung der allgemeinen Formel II, bzw. die dazu isomeren Formen eingesetzt,



I



I



dabei bedeuten:

- R einen Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinrest mit 14 bis 22 C-Atomen
- O Sauerstoff
- PC einen Phosphocholin- oder einen modifizierten Phosphocholinrest
- X einen Halogen- oder einen Methoxyrest.

Bevorzugte Verbindungen sind 1-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycerophosphocholin, 1-Hexadecyl-2-chlor-rac-glycero-3-phosphocholin sowie seine Isomere und 1-Hexadecylthio-2-methoxymethyl-rac-glycero-3-phosphocholin.

Als PEG-Lipid wird bevorzugt polyethylenglycolmodifiziertes Phosphatidylethanolamin vom Molekulargewichtsbereich 1000–6000 Dalton eingesetzt. Es eignen sich unter anderem 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol, MG ~ 2700 (PEG-DPPE) und 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol, MG ~ 5750 (PEG-DSPE). Vorteilhaft ist auch der Einsatz von Verbindungen, die gleichzeitig PEG-Lipid und antineoplastisch wirksames Phospholipid-Analoges sind, wie Hexadecylphosphoethanolamin-N-polyethylenglycol.

Die liposomale Form besteht bevorzugt aus einschichtigen oder mehrschichtigen Vesikeln, oder die Liposomen liegen als "reverse evaporation vesicles" vor.

Die cancerostatische Wirkung des erfindungsgemäßen Mittels läßt sich z. B. an Nacktmäusen belegen. So zeigte das Mittel aus Hexadecylphosphocholin, Cholesterol sowie 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol, MG ~ 2750 (PEG-DSPE) im Molverhältnis 1 : 1 : 0,05 eine Hemmung des Wachstums des humanen Brustkarzinoms Ma-Tu > 95%, während freies Hexadecylphosphocholin (HPC) bzw. liposomales HPC ohne PEG-Lipid Wachs-

tumshemmungen von etwa 50% ergeben. Dabei beziehen sich die Hemmungen auf den Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Tumorthherapie ist pharmazeutisch stabil, physiologisch hervorragend verträglich und insbesondere zur intravenösen Applikation geeignet. Letzterer Vorteil ergibt sich auch dadurch, daß im Gegensatz zu Alkylphospholipidliposomen ohne PEG-Lipid die Alkylphospholipidliposomen mit PEG-Lipid eine sehr einheitliche Größe multischichtiger Liposomen zeigen. Ein weiterer Vorteil ist, daß ein Zusatz toxikologisch bedenklicher Lipide mit positiver oder negativer Oberflächenladung nicht nötig ist, da die an und für sich zwitterionischen PEG-Lipide infolge der Abschirmung einer Ladung durch die voluminöse PEG-Gruppe sich wie eine Verbindung mit Oberflächenladung verhalten. Das Mittel ist deshalb für eine Anwendung in der Tumorthherapie hervorragend geeignet.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Hexadecylphosphocholin (HPC, Miltefosin) (10 mmol), Cholesterol (CH), (10 mmol) und 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol (PEG-DPPE), (MG ~ 2700) (1 mmol) werden in 50 ml Chloroform gelöst. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der feinverteilte Lipidfilm mit 500 ml phosphatgepufferter, isotonischer Kochsalzlösung, pH 7,4, auf der Schüttelmaschine mindestens 2 h intensiv bewegt. Die so gebildeten multischichtigen Liposomen (MLV) werden ohne weitere Behandlung eingesetzt, z. B. für Tierversuche. Der Gehalt an HPC, CH und PEG-DPPE wird mittels HPLC oder HPTLC bestimmt. Größenmessung der Liposomen mittels Lichtstreuung ergibt, daß ca. 95% der Vesikel einen Durchmesser von etwa 3000 nm haben.

Beispiel 2

Zur Herstellung von vorwiegend einschichtigen Vesikeln (SUV) werden die MLV aus Beispiel 1 beschallt, bis eine Teilchengröße < 100 nm erreicht ist. Die gebildete Liposomendispersion wird dann 30 min bei 100 000 x g zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Gehalts- und Größenbestimmung erfolgen wie in Beispiel 1. Die gebildeten SUV haben einen Durchmesser von 60–75 nm.

Beispiel 3

Octadecylphosphocholin (OPC), (10 mmol), Cholesterol (CH), (10 mmol), 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol (PEG-DSPE), (MG ~ 2750), (1 mmol) und Dicetylphosphat (DCP), (2 mmol) werden in gleicher Weise und mit gleicher Puffermenge wie in Beispiel 1 in MLV überführt. Zur Herstellung von SUV wird die MLV Dispersion nacheinander durch Polycarbonatfilter mit Porenweiten von 2,0; 1,0; 0,8 und 0,4 nm gepreßt.

Beispiel 4

1-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycerophosphocholin (Et-18-OCH₃), (1 mmol), Cholesterol (CH), (1 mmol), 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-

N-polyethylenglycol (PEG-DPPE), (MG ~ 2700), (0,1 mmol) und Dicetylphosphat (DCP), (0,1 mmol) werden wie in Beispiel 1 in eine MLV Dispersion umgewandelt (50 ml Puffer). SUV werden analog zu Beispiel 3 erhalten.

Beispiel 5

HPC, CH, PEG-DPPE (Molverhältnis 1 : 1 : 0,05) werden ausgehend von 1 mmol HPC wie in Beispiel 1 in einen Lipidfilm übergeführt und dieser mit 50 ml Citratpuffer, pH 4,0 in multischichtige Liposomen umgewandelt. Durch Beschallung wie in Beispiel 2 werden SUV erhalten. Jetzt wird der außerhalb der Liposomen befindliche Puffer durch Gelchromatographie an Sephadex G 50 in phosphatgepufferter, isotonischer Kochsalzlösung (PBS), (pH 7,4) gegen PBS ausgetauscht und die Liposomendispersion bei 40°C mit einer gesättigten, wäßrigen Lösung von Mitoxantron (0,1 mmol) inkubiert. Gelchromatographie an einem Aliquot zeigt, daß alles Mitoxantron liposomal assoziiert ist.

Beispiel 6

Es wird wie in Beispiel 3 verfahren, jedoch enthält der Puffer zusätzlich 0,5 mmol Daunorubicin. Gelchromatographie an einem Aliquot der SUV Dispersion zeigt, daß mehr als 90% des Daunorubicins liposomal assoziiert sind.

Beispiel 7

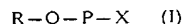
2,5 mmol ²⁰⁰⁰Polyethylenglycol-monomethylether werden in Toluol gelöst und mit 2,7 mmol 1,1'-Carbonyldiimidazol 15 h am Rückfluß gekocht. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird mit 1,25 mmol Hexadecylphosphoethanolamin und 1,25 mmol Triethylamin in 100 ml Tetrachlorethylen versetzt und die Mischung 8 h auf 95°C erhitzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das reine Hexadecylphosphoethanolamin-N-polyethylenglycol durch Chromatographie an einer Lichroprep RP-18 Säule (Merck Darmstadt) erhalten.

Beispiel 8

Das humane Brustcarcinom MaTu s.c. auf Nacktmäuse implantiert wird mit einer gemäß Beispiel 1 hergestellten SUV Dispersion (HPC-SUV + PEG) behandelt. Als Kontrollen dienen Tiere, die freies HPC, HPC Liposomen ohne PEG Derivat (HPC-SUV – PEG), bzw. physiologische Kochsalzlösung erhalten. Als Kriterium der Wirksamkeit dient das Tumolvolumen im Vergleich zum Tumolvolumen der Kontrollgruppen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.

Patentansprüche

1. Mittel zur Tumorthherapie in Form von Liposomen, enthaltend ein Phospholipid-Analoges und Cholesterol, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich ein polyethylenglycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid) enthält.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Phospholipid-Analoges Alkylphospholipide der allgemeinen Struktur I eingesetzt werden,



dabei bedeuten:

R einen Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylrest mit 12 bis

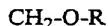
22 C-Atomen

O Sauerstoff oder Schwefel

P Phosphor

X einen Cholin- oder einen modifizierten Cholin-
rest, einen Serin- oder einen Ethanolaminrest.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß als Phospholipid-Analoges Etherlipide der all-
gemeinen Formel II, bzw. die dazu isomeren For-
men eingesetzt werden,

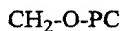


I

X-CH

(II)

I



dabei bedeuten:

R einen Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinrest mit 12 bis

22 C-Atomen

O Sauerstoff

PC einen Phosphocholin- oder einen modifizierten
Phosphocholinrest

X einen Halogen- oder einen Methoxyrest.

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß als PEG-Lipid polyethylenglycolmodifiziertes
Phosphatidylethanolamin, Molekulargewichtsbe-
reich 1000—6000 Dalton, eingesetzt wird.

5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß als PEG-Lipid

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-
amin-N-polyethylenglycol, MG ~ 2700 (PEG-
DPPE) oder

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-
N-polyethylenglycol, MG ~ 5750 (PEG-DSPE)
eingesetzt wird.

6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß als Phospholipid-Analoges und als PEG-Lipid
ein und dieselbe Verbindung eingesetzt wird, vor-
zugsweise Hexadecylphosphoethanolamin-N-poly-
ethylenglycol.

7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Komponenten im Molverhältnis Phospholi-
pid : Cholesterol : PEG-Lipid = 1 : 0,5 : 0,05 bis
1 : 1 : 0,25 vorliegen.

8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß es Hexadecylphosphocholin (Miltefosin), Cho-
lesterol und 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-
ethanolamin-N-polyethylenglycol (PEG 2000 PE
oder PEG 5000 PE) enthält.

9. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die liposomale Form aus multischichtigen oder
einschichtigen Vesikeln besteht, bzw. die Liposo-
men als "reverse evaporation vesicles" vorliegen.

10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, daß in die Liposomen ein oder mehrere zusätz-
liche Wirkstoffe eingeschlossen oder in oder an die
Lipidmembran inseriert sind.

- Leerseite -

Abb. 1

